

Comparison of Nucleus and Cytoplasm Diameter of Buccal Mucosa Cells in Cigarette Smokers and Nonsmokers: A Cytomorphometric Study using Feulgen and Papanicolaou Stains

Mohammad Javad Hassanzadeh¹ , Noushin Jalayer Naderi^{*} 

¹ Dept of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 03 November 2021

Revised: 24 April 2022

Accepted: 07 June 2022

Published Online: 21 January 2023

* Correspondence to:

Noushin Jalayer Naderi
Dept of Oral and Maxillofacial
Pathology, Faculty of Dentistry,
Shahed University, Tehran, Iran.
Email:
jalayer@shahed.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: A decrease in cell size and an increase in nuclear dimension due to changes in the amount of DNA could be an indicator of early detection of malignant changes. This study aimed to compare the nuclear and cytoplasmic diameters of buccal mucosa cells in cigarette smokers and nonsmokers in a cytomorphometric study using Feulgen and Papanicolaou stains.

Material & Methods: In this case-control study, cytological smears of human buccal mucosa cells stained with Feulgen and Papanicolaou of 30 smokers and 15 controls who had never smoked were compared regarding the cytoplasm size and nucleus diameter. Moreover, the difference among the mean values of the cytoplasm size, nucleus diameter, and nucleus-to-cytoplasm ratio in the case and control samples regarding the Feulgen and Papanicolaou stained slides were analyzed using the Independent Samples t-Test.

(Ethic code: IR.SHAHED.REC.1399.127)

Findings: The mean cytoplasm size of smokers stained with Feulgen was significantly higher than that of Papanicolaou-stained samples in smokers ($P=0.01$). There was no significant difference between the mean diameter of the nucleus and the nucleus-to-cytoplasm ratio of smokers stained with Feulgen and Papanicolaou ($P=0.2$ and $P=0.1$, respectively).

Discussion & Conclusion: In buccal mucosa cells of cigarette smokers, Feulgen and Papanicolaou staining methods had the same outcomes in demonstrating the morphometric changes of the nucleus; however, there were no differences in revealing cytoplasm diameter.

Keywords: Buccal mucosa, Cigarette smoking, Cytology, Smoking

➤ How to cite this paper

Hassanzadeh M J, Jalayer Naderi N. Comparison of Nucleus and Cytoplasm Diameter of Buccal Mucosa Cells in Cigarette Smokers and Nonsmokers: A Cytomorphometric Study using Feulgen and Papanicolaou Stains. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(6): 52-60.

مقایسه قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم سلول های مخاط باکال در افراد سیگاری و غیرسیگاری: بررسی سیتومرفومتریک با استفاده از رنگ های فلوگن و پاپانیکولاو

محمدجواد حسن زاده^۱  ، نوشین جلایر نادری^{۱*} 

^۱ گروه آسیب شناسی دهان و فک، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱

نویسنده مسئول:

نوشین جلایر نادری

گروه آسیب شناسی دهان و فک ،
دانشکده دندان پزشکی ، دانشگاه
شاهد ، تهران ، ایران.

Email:
jalayer@shahed.ac.ir

واژه های کلیدی: دخانیات، سیگار، سیتولوژی، مخاط باکال

مقدمه: کاهش اندازه سلول و افزایش قطر هسته که ناشی از تغییر میزان DNA در هسته است، می تواند شاخصی برای نمایش زودرس تغییرات بدخیمی باشد. هدف از مطالعه حاضر مقایسه اندازه سیتوپلاسم و قطر هسته سلول های مخاط باکال در افراد سیگاری و غیرسیگاری در یک بررسی سیتومرفومتریک با استفاده از رنگ های فلوگن و پاپانیکولاو بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، اسمیرهای سیتولوژیک مخاط باکال رنگ شده با رنگ های هیستوشیمیایی فلوگن و پاپانیکولاو به دست آمده از ۳۰ فرد سیگاری با ۱۵ نمونه کنترل، از نظر قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم مقایسه شدند. تفاوت میانگین اندازه سلول، میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم گروه های مورد و شاهد در رنگ آمیزی های فلوگن و پاپانیکولاو با آزمون Independent Samples t-Test آنالیز گردید.

یافته ها: میانگین اندازه سیتوپلاسم نمونه های سیگاری رنگ شده با فلوگن به طور معنی داری بیشتر از نمونه های سیگاری رنگ شده با پاپانیکولاو بود ($P=0.01$). میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه های سیگاری رنگ شده با فلوگن و پاپانیکولاو تفاوت معناداری نداشت (به ترتیب $P=0.2$ و $P=0.1$).

بحث و نتیجه گیری: در سلول های مخاط باکال افراد سیگاری، رنگ آمیزی فلوگن و پاپانیکولاو در نمایش تغییرات مرفومتریکی هسته عملکرد مشابهی دارند؛ اما نتایج یکسانی در نمایش اندازه سیتوپلاسم ندارند.

استناد: حسن زاده، محمد جواد؛ جلایر نادری، نوشین. مقایسه قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم سلول های مخاط باکال در افراد سیگاری و غیرسیگاری: بررسی سیتومرفومتریک با استفاده از رنگ های فلوگن و پاپانیکولاو. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۱؛ ۳۰(۶): ۵۲-۶۰.

عوامل شیمیایی مختلف قادرند سبب سمیت سلولی و بروز تغییرات ژنوتوکسیک و سیتوتوکسیک در سلول‌ها شوند. این تغییرات با افزایش تعداد میکرونوکلئوس‌ها در هسته و پدیده‌های کاریولیز، کاریورکسی و پیکنوز مشخص می‌شوند (۱). مطالعات نشان داده‌اند که کشیدن سیگار سبب بروز تغییرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک در سلول‌های مخاط باکال انسان می‌گردد. کشیدن سیگار با افزایش تعداد میکرونوکلئوس‌ها در هسته (۲-۴) و افزایش میزان کاریولیز، کاریورکسی و پیکنوز همراه است (۵-۹). علاوه بر تعداد میکرونوکلئوس‌ها و تغییرات آپپتوتیک که نشان‌دهنده تغییر به‌سوی بدخیمی و مرگ سلول است، مؤلفه‌های مرفومتریک تعریف‌شده در بررسی کمی نمونه‌های اکسفولیاتیو مانند اندازه هسته، اندازه سلول، نسبت هسته به سیتوپلاسم و شکل سلول نیز در تعیین ریسک ابتلا به ضایعات پیش‌بدخیم اپی‌تلیالی تعیین‌کننده هستند (۱۰).

افزایش قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم به‌ترتیب نشان‌دهنده افزایش میزان DNA هسته و تغییر اندازه هسته است (۱۱، ۱۲). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اندازه قطر هسته از مخاط طبیعی به‌سوی کارسینوم سلول سنگ‌فرشی دهان بیشتر می‌شود و قطر سیتوپلاسم کاهش می‌یابد. محققین بر این باورند که کاهش اندازه سلول و افزایش اندازه هسته که ناشی از تغییر میزان DNA در هسته است، می‌توانند به‌عنوان شاخصی برای نمایش زودرس تغییرات بدخیمی به‌کار روند (۱۳).

بیومانی‌تورینگ سلول‌های مخاط باکال افراد در معرض عوامل ژنوتوکسیک، روشی ساده و قابل‌اعتماد برای بررسی افراد مستعد ابتلا به ضایعات پیش‌بدخیم و سرطان است (۱۶-۱۴). ارزیابی صدمات سیتوژنتیک در مخاط باکال روشی ساده است که نشان می‌دهد سلول‌ها در معرض خطر ابتلا به سرطان هستند. با استفاده از روش سیتولوژی اکسفولیاتیو، کشف زودرس تغییرات پیش‌بدخیم ساده‌تر می‌شود (۹). مطالعات سیتولوژی اکسفولیاتیو به‌سبب روش ساده‌تر و پایایی و روایی نتایج، در مقایسه با سایر روش‌های تشخیص

ضایعات پیش‌بدخیم همانند بیوپسی، بیومارکرها، DNA پلوییدی و روش‌های اپتیکال که گران‌ترند و روش پیچیده‌تری دارند، اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

تعداد مصرف‌کنندگان تنباکو در بیماران مبتلا به کارسینوم دهان چهار برابر بیشتر از جمعیت طبیعی است. خطر ایجاد دومین سرطان اولیه در بخش فوقانی دستگاه گوارش بیماران با سرطان درمان‌شده که همچنان استعمال سیگار را ادامه می‌دهند، ۲ تا ۶ برابر بیشتر از کسانی است که پس از تشخیص، این عادت را کنار گذاشته‌اند (۱۷). مطالعات نشان داده‌اند که سیگار ریسک فاکتور ژنوتوکسیک و سیتوتوکسیک در بروز تغییرات هسته است. رنگ‌های هیستوشیمیایی به‌کاررفته در نمایش این تغییرات می‌توانند سبب به‌دست آمدن نتایج مثبت/منفی کاذب شوند. تحقیق نرزیسیان و همکاران حتی به‌طور واضح‌تری نشان داده است که رنگ‌های هیستوشیمیایی معمول مانند گیمسا، در مقایسه با یک رنگ اختصاصی DNA مانند فلوگن، در نمایش تغییرات هسته عملکرد ضعیف‌تری دارند (۱).

به‌سبب سهولت کار با رنگ پاپانیکولاو، محققان تمایل دارند از این رنگ برای بررسی تغییرات هسته استفاده کنند (۱۶، ۱۱، ۱۰). استفاده از یک رنگ غیراختصاصی ممکن است با نتایج مخدوش‌کننده همراه باشد، درحالی‌که به‌کار بردن یک رنگ اختصاصی در بررسی سیتولوژیک می‌تواند زاویه‌ای از تغییرات هسته را مشخص کند که یک رنگ غیراختصاصی در نمایش آن کارایی لازم را ندارد. با لحاظ کردن اهمیت رنگ هیستوشیمیایی به‌کاررفته در نمایش تغییرات هسته، هدف از پژوهش حاضر مقایسه اندازه سیتوپلاسم و قطر هسته سلول‌های مخاط باکال در افراد سیگاری و غیرسیگاری در یک بررسی سیتومرفومتریک با استفاده از رنگ‌های فلوگن و پاپانیکولاو بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به روش مورد-شاهدی انجام شد. با لحاظ کردن پژوهش پیشین (۷)، در بررسی با analysis

درجه سانتی گراد قرار گرفتند و برای ۳ دقیقه در آب مقطر شسته شدند؛ سپس اسمیرها با معرف شیف برای حدود ۹۰ دقیقه رنگ گردیدند و برای ۱۰ دقیقه با آب جاری شسته شدند. اسمیرها ۳ بار در حلال سدیم متا بی سولفیت نیم درصد غوطه ور گردیدند و بعد با آب جاری شسته شدند. اسمیرها توسط رنگ سبز روشن (Light Green) یک درصد رنگ گردیدند و برای بررسی میکروسکوپی مانت شدند (۱۸).

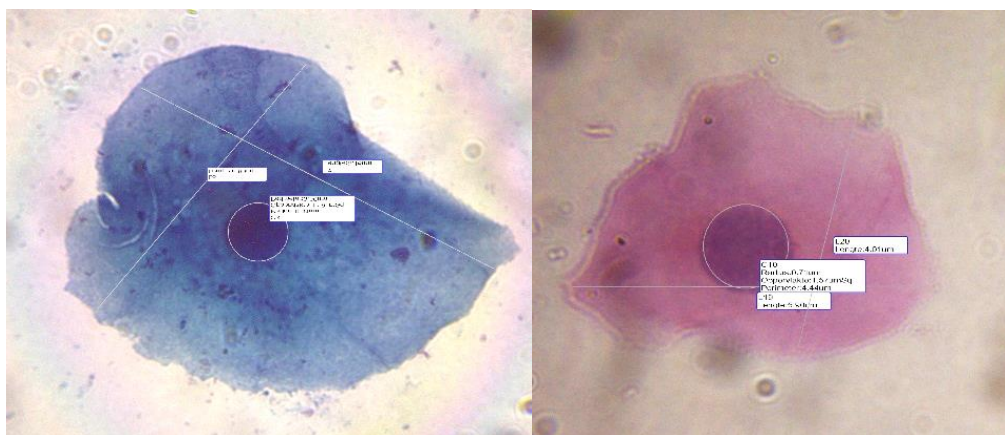
برای رنگ آمیزی پاپانیکولائو از روش روتین استفاده گردید. اسلایدها به مدت ۲ دقیقه، به ترتیب در الکل های ۷۰ درصد و ۵۰ درصد قرار گرفتند؛ سپس با آب شسته و به مدت ۴ دقیقه در همتاکسیلین گذاشته شدند. پس از شستشو به مدت ۵ ثانیه، در اسید الکل قرار گرفتند. پس از دهیدره شدن در الکل مطلق، به مدت ۱۰ ثانیه با orange G رنگ گردیدند. استفاده از EA 50 PAP reagent، الکل مطلق، گزلیل و مانت شدن مراحل نهایی آماده سازی نمونه ها بودند.

در بررسی نمونه ها، سلول های بدون همپوشانی که بهترین کیفیت رنگ آمیزی و حاشیه و هسته واضح و مشخص داشتند، برای بررسی قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم انتخاب شدند. قطر سلول و اندازه هسته ۵۰۰ سلول از هر نمونه تحت بزرگنمایی $\times 1000$ با استفاده از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS BX40) مجهز به دوربین دیجیتال (Sony ExWaveHAD, Model No. SSC-DC58AP; Tokyo, Japan) اندازه گیری گردید (شکل شماره ۱). برای هر اسلاید، اندازه سلول (حاصل ضرب بزرگترین افطار طولی و عرضی سلول) به میکرومتر مربع، قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم به واحد میکرومتر تعیین شد (۱۹).

در بررسی آماری نمونه ها از Independent Samples t-test در سطح احتمال $P < 0.05$ ، برای آنالیز معنی دار بودن تفاوت میانگین اندازه سلول، میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم گروه های مورد و شاهد استفاده شد. برای بررسی آماری از بسته نرم افزاری SPSS vol.24 استفاده گردید.

با paired sample t-test power در نرم افزار PASS، با در نظر گرفتن $\alpha = 0.05$ و $\beta = 0.2$ ، انحراف معیار ۱/۲۲ و اختلاف ۱/۵ درصد، نسبت گروه مورد به شاهد معادل ۲ به ۱ به دست آمد و حداقل حجم نمونه در گروه افراد سیگاری ۳۰ و گروه شاهد ۱۵ مورد محاسبه شد. این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه شاهد با کد IR.SHAHED.REC.1399.127 به تصویب رسید. جامعه آماری گروه مورد افراد سیگاری مراجعه کننده به دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد بودند. افراد گروه کنترل از میان افراد غیرسیگاری همین جامعه آماری انتخاب شده اند. معیار ورود نمونه ها به مطالعه شامل موارد ذیل بود: ابتلا نداشتن به بیماری زمینه ای یا سیستمیک، استفاده نکردن از دارو و الکل، استفاده از رژیم غذایی مختلط و نداشتن رادیوگرافی دهان در ۶ ماه گذشته. به منظور حذف عوامل هورمونی و تغییرات سنی روی سلول های مخاط دهان، نمونه های اسمیر گروه مورد و شاهد از مردان در بازه سنی ۲۵ تا ۵۰ سال انتخاب شدند (۷). معیار ورود مطالعه شامل افرادی بود که میزان سیگار کشیدن آنان بر اساس فرمول $\text{Packs} \times \text{Year}$ ، معادل ۵ تا ۳۰ نخ سیگار در روز است و دست کم به مدت ۱۰ سال سیگاری بودند.

از افراد گروه های مورد و شاهد خواسته شد پیش از نمونه گیری، ۲ بار دهانشان را با آب شستشو دهند؛ سپس برای تهیه اسمیر سیتولوژیک، سلول های مخاط باکال توسط اسپاتول پلاستیکی یک بار مصرف از روی سطح مخاط گونه برداشته شد. نمونه های تهیه شده از گونه سمت چپ با رنگ فلوگن و نمونه های گونه سمت راست با رنگ پاپانیکولائو رنگ گردید. سلول های به دست آمده روی لام شیشه ای پخش شدند و بلافاصله در فیکساتیو متانول و اسید استیک glacid به نسبت ۳/۱، مرحله ثبوت را طی کردند. نمونه های تهیه شده به روش تغییر یافته توماس (Modified Thomas) با فلوگن رنگ گردیدند. در این روش، اسلایدها برای ۱۰ دقیقه در 1 N HCL در دمای ۶۰



الف

ب

شکل شماره ۱. الف. تعیین قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم سلول مخاط باکال فرد سیگاری (رنگ آمیزی فلوگن $\times 1000$)؛ ب. تعیین قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم سلول مخاط باکال فرد غیر سیگاری (رنگ آمیزی پاپانیکولاو $\times 1000$)

یافته ها

میانگین سنی افراد سیگاری $35/8 \pm 10/8$ سال و افراد غیر سیگاری $28/9 \pm 3/9$ سال بود. جدول شماره ۱ میانگین قطر هسته، اندازه سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم را در افراد سیگاری و غیر سیگاری با رنگ آمیزی های فلوگن و پاپانیکولاو نشان می دهد.

آزمون Independent Samples t-test نشان داد که قطر هسته، اندازه سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه های سیگاری و غیر سیگاری در رنگ آمیزی فلوگن (به ترتیب $P=0.3$ ، $P=0.6$ و $P=0.7$) تفاوت معنی دار ندارد. در نمونه های رنگ شده با پاپانیکولاو قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم افراد غیر سیگاری بیشتر از افراد سیگاری بود (به ترتیب $P=0.007$ و $P=0.04$). میانگین نسبت هسته به سیتوپلاسم میان دو گروه تفاوت نداشت ($P=0.7$).

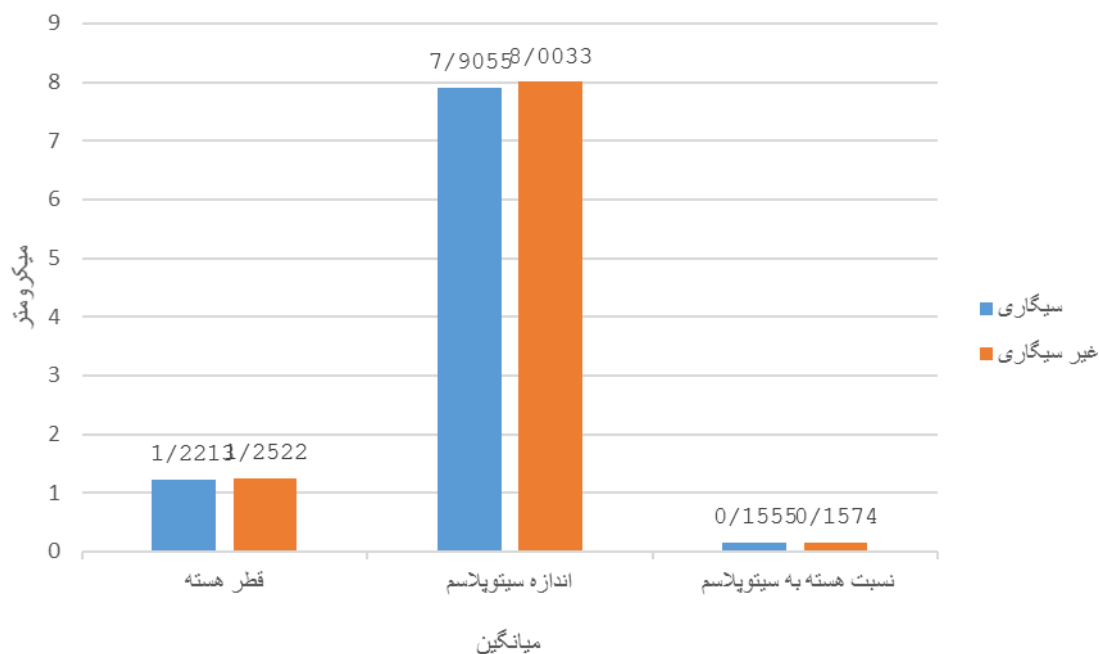
مقایسه نمونه های رنگ شده فلوگن و پاپانیکولاو با

آزمون Independent Samples t-test در شکل شماره ۱ نشان داد که میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه های سیگاری رنگ شده با فلوگن و نمونه های سیگاری رنگ شده با پاپانیکولاو تفاوت معناداری ندارد (به ترتیب $P=0.2$ و $P=0.1$). میانگین اندازه سیتوپلاسم نمونه های سیگاری رنگ شده با فلوگن به طور معنی دار، بیشتر از نمونه های سیگاری رنگ شده با پاپانیکولاو بود ($P=0.01$). میانگین قطر هسته، اندازه سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه های غیر سیگاری رنگ شده با فلوگن و نمونه های غیر سیگاری رنگ شده با پاپانیکولاو تفاوت معناداری نداشتند (به ترتیب $P=0.4$ ، $P=0.9$ و $P=0.5$). شکل های شماره ۲ و ۳ مقایسه میانگین مؤلفه های مرفومتريک گروه های سیگاری و غیر سیگاری در رنگ آمیزی فلوگن و پاپانیکولاو را نشان می دهند.

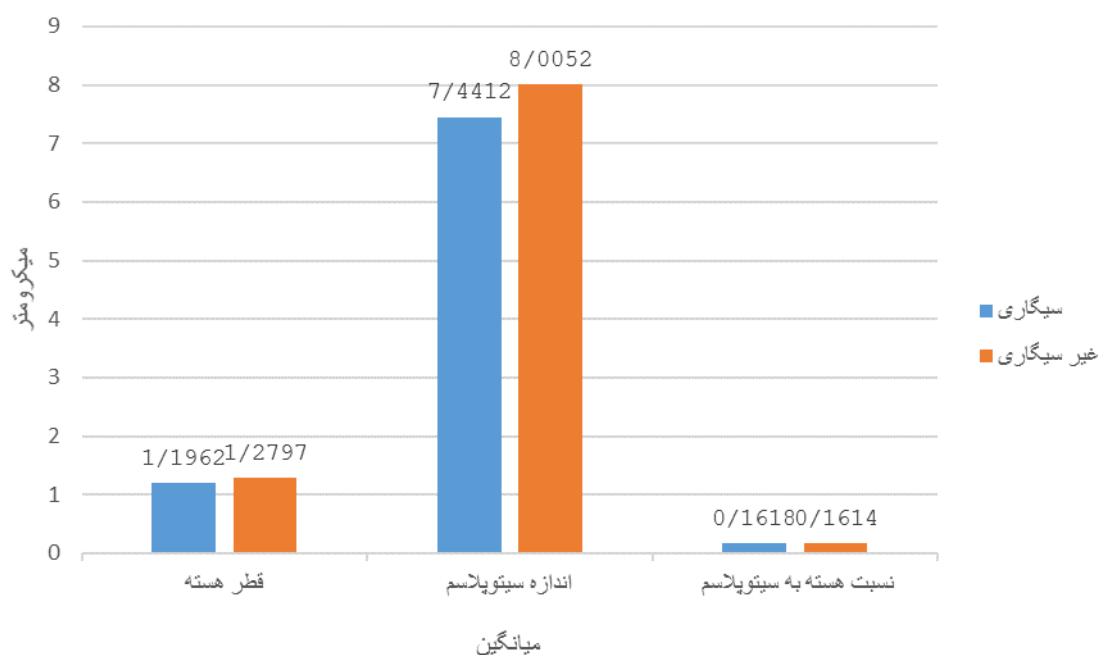
جدول شماره ۱. میانگین قطر هسته، اندازه سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم افراد سیگاری و غیر سیگاری در رنگ آمیزی های فلوگن و پاپانیکولاو *

گروه	پاپانیکولاو		فلوگن		نسبت هسته به سیتوپلاسم
	اندازه سیتوپلاسم*	نسبت هسته به سیتوپلاسم	اندازه سیتوپلاسم*	نسبت هسته به سیتوپلاسم	
سیگاری	7.44 ± 0.62	0.16 ± 0.01	7.90 ± 0.72	0.15 ± 0.01	قطر هسته
غیر سیگاری	8.00 ± 0.96	0.16 ± 0.017	8.00 ± 0.77	0.15 ± 0.01	قطر هسته

* واحد به میکرومتر مربع است.



شکل شماره ۲. میانگین مؤلفه های مرفومتريک گروه سیگاری و غیرسیگاری در رنگ آمیزی فلوگن



شکل شماره ۳. میانگین مؤلفه های مرفومتريک گروه سیگاری و غیرسیگاری در رنگ آمیزی پاپانیکولائو

بحث و نتیجه گیری

یافته های مطالعه نشان داد، میانگین اندازه سیتوپلاسم در افراد غیرسیگاری در مقایسه با افراد سیگاری بزرگ تر و قطر هسته کوچک تر است؛ اما میانگین قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم میان افراد سیگاری و غیرسیگاری در نمونه های رنگ شده با فلوگن تفاوت معنی داری نداشت. در نمونه های رنگ شده با پاپانیکولائو، اندازه سیتوپلاسم افراد غیرسیگاری

بزرگ تر از افراد سیگاری بود. مقایسه نمونه های رنگ شده فلوگن و پاپانیکولائو نشان داد که میانگین اندازه سیتوپلاسم نمونه های سیگاری رنگ شده با فلوگن به طور معنی دار، بیشتر از نمونه های سیگاری رنگ شده با پاپانیکولائو است. قطر هسته سلول های بدخیم به سبب افزایش مواد مورد نیاز برای نسخه برداری افزایش می یابد؛ اما از سوی دیگر، توانایی تولید سیتوپلاسم توسط این سلول ها پایین

می‌آید. کاهش اندازه سلول و افزایش اندازه هسته که ناشی از تغییر میزان DNA در هسته است، می‌تواند شاخصی برای نمایش زودرس تغییرات بدخیمی باشد (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از تنباکوی غیرتدخینی سبب کاهش معنی‌دار قطر سلول و افزایش قطر هسته می‌شود (۲۱، ۲۰، ۱۱، ۱۰). همسو با مطالعات پیشین، یافته‌ها نشان داد که میانگین اندازه سیتوپلاسم در افراد غیرسیگاری در مقایسه با افراد سیگاری بزرگ‌تر و قطر هسته کوچک‌تر است؛ اما میانگین قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم میان افراد سیگاری و غیرسیگاری در نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن تفاوت معنی‌داری نداشت. تفاوت یافته‌ها می‌تواند ناشی از ترکیبات متفاوت مواد تدخینی موجود در سیگار و تنباکوی غیرتدخینی، مدت‌زمان بیشتر مجاورت تنباکوی غیرتدخینی با مخاط و اصطکاک ناشی از این مواد روی مخاط دهان باشد. این تفاوت نشان می‌دهد که تغییرات هسته و سیتوپلاسم در افرادی که از تنباکوی غیرتدخینی استفاده می‌کنند، بارزتر است. از آنجاکه در حین تبدیل یک سلول طبیعی سالم به سلولی با تغییرات بدخیمی، به تدریج هسته سلول بزرگ‌تر و سیتوپلاسم کوچک‌تر می‌شود، می‌توان احتمال داد که اثر کارسینوژنیک تنباکوی غیرتدخینی بر سلول زودتر از سیگار مشاهده می‌گردد.

در نمونه‌های رنگ‌شده با پاپانیکولاو، اندازه سیتوپلاسم افراد غیرسیگاری به‌طور معنی‌دار بیشتر از افراد سیگاری بود. این یافته با مطالعات پیشین مطابقت دارد که در آن‌ها از رنگ پاپانیکولاو در نمایش تغییرات هسته و سیتوپلاسم مخاط باکال افراد سیگاری و مصرف‌کنندگان تنباکو استفاده‌شده بود (۲۱، ۱۰). برخلاف آن، مطالعه یامالا و همکاران با استفاده از رنگ پاپانیکولاو نشان داد که قطر سیتوپلاسم در افراد سیگاری با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد (۲۲). تفاوت در یافته‌ها می‌تواند ناشی از روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی، اختلاف در تعداد سلول‌های شمارش‌شده و دقت ابزار اندازه‌گیری باشد. بدیهی است، مطالعات اخیر به‌سبب بهره‌گیری از ابزارهای دقیق‌تر با نتایج پایاتر همراه‌اند. برخلاف نتایج به‌دست‌آمده با رنگ‌آمیزی پاپانیکولاو،

میانگین قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم میان افراد سیگاری و غیرسیگاری در نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن تفاوت معنی‌داری نداشت. منبعی برای مقایسه این نتیجه در رنگ‌آمیزی فلوگن به‌دست نیامد.

استفاده از رنگ هیستوشیمیایی نامناسب در نمایش تغییرات هسته می‌تواند سبب نتایج مخدوش‌کننده مثبت یا منفی کاذب شود. رنگ‌های هیستوشیمیایی معمول مانند گیمسا، در مقایسه با یک رنگ اختصاصی DNA مانند فلوگن، در نمایش تغییرات هسته عملکرد ضعیف‌تری نشان داده‌اند (۱). استفاده از یک رنگ هیستوشیمیایی مناسب در بررسی سیتولوژیک هسته و مشاهده تغییرات بدخیمی آن اهمیت فراوانی دارد. در این مطالعه دقت رنگ‌های فلوگن و پاپانیکولاو در نمایش تغییرات سیتومرفومتریک سلول مقایسه شد. میانگین قطر هسته، اندازه سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه‌های غیرسیگاری رنگ‌شده با فلوگن و نمونه‌های غیرسیگاری رنگ‌شده با پاپانیکولاو تفاوت معناداری نداشت. این یافته نشان می‌دهد که رنگ‌های فلوگن و پاپانیکولاو در نمایش ابعاد هسته و سلول گروه کنترل که در معرض عامل کارسینوژن نبوده‌اند، مشابه عمل کرده‌اند. در گروه سیگاری تفاوت معنی‌داری میان میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن و نمونه‌های رنگ‌شده با پاپانیکولاو وجود نداشت؛ اما میانگین اندازه سیتوپلاسم نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن به‌طور معنی‌دار، بیشتر از نمونه‌های رنگ‌شده با پاپانیکولاو بود. از آنجاکه میانگین قطر هسته در نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن و پاپانیکولاو تفاوت معنی‌داری نداشت، می‌توان نتیجه گرفت که کشیدن سیگار در این مطالعه تغییر معنی‌داری در محتوای DNA هسته افراد سیگاری ایجاد نکرده است. این یافته با نتایج به‌دست‌آمده از رنگ‌آمیزی قطر هسته و اندازه سیتوپلاسم نمونه‌های سیگاری و غیرسیگاری با فلوگن هماهنگ است. از آنجاکه قطر هسته میان دو رنگ‌آمیزی تفاوت معنی‌داری ندارد، وسعت بیشتر سیتوپلاسم در رنگ‌آمیزی فلوگن نشان‌دهنده دقت این رنگ در نمایش تغییرات موجود است؛ زیرا نشان

غیرسیگاری در مقایسه با افراد سیگاری، بزرگ تر و قطر هسته کوچک تر است. از آنجا که بروز بدخیمی ناشی از کشیدن سیگار وابسته به دوز است، توصیه می شود در مطالعات آینده، تأثیر میزان کشیدن سیگار در ارتباط با تغییرات سیتومرفومتریک سلول بررسی گردد. در سلول های مخاط باکال افراد سیگاری، رنگ آمیزی فلوگن و پاپانیکولانو در نمایش تغییرات مرفومتریک هسته عملکرد مشابهی دارند؛ اما نتایج یکسانی در نمایش اندازه سیتوپلاسم نشان نمی دهند.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه دکتری عمومی دندان پزشکی نویسنده اول به شماره ۹۱۲ از دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد است. بدین وسیله از تمامی افرادی که در انجام این تحقیق یاری نموده اند تقدیر می گردد.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.SHAHED.REC.1399.127

References

1. Nersesyan A, Kundi M, Atefie K, Schulte-Hermann R, et al. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:1835-40. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0248.
2. Wu PA, Loh CH, Hsieh LL, Liu TY, Chen CJ, et al. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutat Res* 2004; 562:27-38. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.05.004.
3. Haveric A, Haveric S, Ibrulj S. Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicol Mech Methods* 2010; 20:260-6. doi: 10.3109/15376516.2010.482962.
4. Konopacka M. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. *Neoplasma* 2003; 50:380-2.
5. Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, et al. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L509-16. doi: 10.1152/ajplung.2001.281.2.L509.
6. Comer DM, Elborn JS, Ennis M. Inflammatory and cytotoxic effects of acrolein, nicotine, acetylaldehyde and cigarette smoke extract on human nasal epithelial cells. *BMC Pulm Med* 2014; 14:32. doi: 10.1186/1471-2466-14-32.
7. Jalayer Naderi N, Pour Pasha M. Comparison of cytotoxic effect of cigarette and waterpipe smoking on human buccal mucosa. *Int J Prev Med* 2017; 8:98. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_62_17.
8. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: Methods development. *Mutat Res* 1992; 271:69-77. doi: 10.1016/0165-1161(92)90033-i.
9. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2009; 4:825-37. doi: 10.1038/nprot.2009.53.
10. Einstein TB, Sivapathasundharam B. Cytomorphometric analysis of the buccal mucosa of tobacco users. *Indian J Dent Res* 2005; 16:42-6.
11. Hande AH, Chaudhary MS. Cytomorphometric analysis of buccal mucosa of tobacco chewers. *Rom J Morphol Embryol* 2010; 51:527-32.
12. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J R Soc Med* 1988; 81:509-13. doi: 10.1177/014107688808100905.

می دهد، فضایی از ابعاد حقیقی سیتوپلاسم در مقابل افزایش قطر هسته کاهش نیافته است. بر اساس مشاهدات موجود، فلوگن سبب وضوح مشاهده تغییرات DNA در هسته می شود، درحالی که هسته در رنگ آمیزی با پاپانیکولانو پهن تر به نظر می رسد و حاشیه واضحی ندارد (۲۳). در متد فلوگن، رنگ شیف سبب نمایش داکسی ریبونوکلئوپروتئین می گردد و کروماتین رنگ می گیرد؛ بدین سبب، هسته به وضوح مشاهده می شود و ابعاد آن با سهولت بیشتری قابل اندازه گیری خواهد بود. نسبت هسته به سیتوپلاسم در تبدیل سلول های خوش خیم به سوی بدخیم افزایش می یابد؛ اما در این مطالعه، نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه های سیگاری رنگ شده با فلوگن و نمونه های سیگاری رنگ شده با پاپانیکولانو تفاوت معنی داری نداشت.

مهم ترین محدودیت مطالعه حاضر نبود وحدت رویه در تعداد سلول های شمارش شده مطالعات پیشین است. شمارش سلولی در مطالعات مختلف از ۱۰۰ تا ۲۰۰ سلول متفاوت بود. از آنجا که افزایش شمارش سلول می تواند روایی مطالعه را افزایش دهد، بر اساس مطالعات مرفومتریک پیشین، در این مطالعه ۵۰۰ سلول در هر نمونه بررسی شد (۲۴، ۷). یافته های مطالعه نشان داد، میانگین قطر سیتوپلاسم در افراد

13. Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27:83-6. doi: 10.1111/j.1600-0714.1998.tb02099.x.
14. Freitas MD, García-García A, Carneiro JLM, Crespo- Abeleira A, Gándara-Rey JM. Exfoliative cytology of the oral mucosa: a cytomorphometric comparison of healthy oral mucosa in oral cancer patients and healthy subjects. *Revista Brasileira de Patologia Oral* 2003; 2:2-6.
15. Navone R, Pentenero M, Gandolfo S. Liquid-based cytology in oral cavity squamous cell cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 19:77-81. doi: 10.1097/MOO.0b013e328343af10.
16. Udayashankar U, Guduru VS, Ananthaneni A, Ramisetty SD, Kuberappa PH, et al. Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. *J Cytol* 2016; 33:125-9. doi: 10.4103/0970-9371.188047.
17. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 4th ed. Canada: Elsevier; 2016.
18. Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis* 2007; 22: 371-9. doi: 10.1093/mutage/gem029.
19. Metgud R, Gupta K, Prasad U, Gupta J. Cytomorphometric analysis of oral submucous fibrosis and leukoplakia using methyl green-pyronin Y, Feulgen staining and exfoliative brush cytology. *Biotech Histochem* 2015; 90:8-13. doi: 10.3109/10520295.2014.919025.
20. Khot K, Deshmane S, Bagri-Manjarekar K, Warke D, Kotak K. A cytomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. *J Nat Sci Biol Med* 2015; 6:S22-4. doi: 10.4103/0976-9668.166055.
21. Nayyar AS, Kartheeki B, Sinha P, Zakaria KA, Chandrakant CR, et al. Cytomorphometric analysis of exfoliated buccal mucosal cells in smokers and tobacco chewers. *Int J Histopathol Interpret* 2017; 6:1-4. doi: 10.4103/ijhi.ijhi_4_17.
22. Syamala B, Chitturi RT, Chandrasekhar P, Prakash Chandra KL, Kumar KK, et al. Cytomorphometric analysis of exfoliated buccal cells to evaluate the malignant changes in individuals with tobacco smoking and chewing habits. *J NTR Uni Health Sci* 2017; 6:143-8. doi: 10.4103/2277-8632.215530.
23. Biesterfeld S, Beckers S, Del Carmen Villa Cadenas M, Schramm M. Feulgen staining remains the gold standard for precise DNA image cytometry. *Anticancer Res* 2011; 31:53-8.
24. Jalayer naderi N. Response to letter to the editor: Is micronucleus assay suitable for cytogenetic biomonitoring the different ways to smoke? *Iran J Pathol* 2020; 15: 352-4. doi: 10.30699/ijp.2020.127517.2390.